

超音波照射が膵臓癌細胞の生存率に及ぼす影響の 基礎検討

Basic research on the effect of ultrasound irradiation on
the survival rate of pancreatic cancer cells

佐藤 貴亮¹、菅俣 浩明¹、西村 裕之¹、竹内 真一¹

¹ 桐蔭横浜大学医用工学部

(2015年3月20日 受理)

1. 背景

膵臓癌とは、原発性膵腫瘍のうち外分泌系における上皮性悪性腫瘍を指す。その大部分は、膵管上皮から生じる浸潤性膵管癌である。膵臓癌は初期にはほとんど自覚症状がなく、しかも進行が早いために、早期発見が非常に難しいという特徴がある。また、膵臓自体が小さい臓器であるため、癌が膵臓外に出やすく、周囲のリンパ節や臓器に転移しやすいという特徴もある。そのため、膵臓癌が発見された段階ではすでに進行していることが多く、摘出手術が行えない事例も多々ある。遠隔転移はないが、周辺重要臓器への浸潤のため切除が困難な局所進行例では化学療法、又は化学放射線療法があり、肝臓や肺への転移や腹膜播種がある遠隔転移例では化学療法が用いられる^[1]。残念ながら、治療が行えたとしても3年以内に再発する可能性が極めて高く、5年後生存率は10～20%程度とされている。

超音波が非侵襲的で体内透過性に優れ、超音波エネルギーを集中させることで治療手段にもなることから、当研究室では超音波を用

いた癌治療法に着目してきた^[2]。周囲の正常細胞に影響を与えずに細胞が死に至るアポトーシスを膵臓癌細胞に起こすことが可能であれば、従来技術で摘出手術が行えない膵臓癌に対する追加療法として、低侵襲な超音波を利用した治療が適応可能であると期待している。

2. 培養方法

超音波照射による膵臓癌細胞の生存率の低下を目的とした本研究では、膵臓癌細胞の一種である、ヒト膵臓腺癌細胞株 MIA-PaCa2 を実験対象として使用した。

MIA-PaCa2 細胞株は、シャーレ底面に接着し、増殖してゆく付着細胞である。また、他の細胞の上に成長する傾向がある。更には、L-アスパラギナーゼに敏感^[3]に反応するという特徴をもっている。MIA-PaCa2 を市販のシャーレに播種し、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) に10% FBS (牛胎児血清)、1% P/S (ペニシリンストレptomycin)、4 mM グルタミンを加えた培

Takaaki SATOU¹, Hiroaki SUGAMATA¹, Hiroyuki NISHIMURA¹ and Shinichi TAKEUCHI¹

1. Faculty of Biomedical Engineering, Toin University of Yokohama, 1614 Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa, 225-8502, Japan

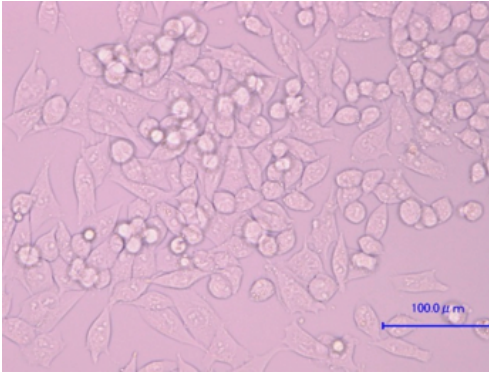


図1 当研究室にて培養した、MIA-PaCa2の位相差顕微鏡写真

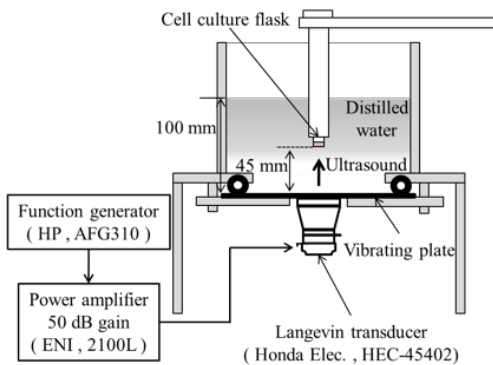


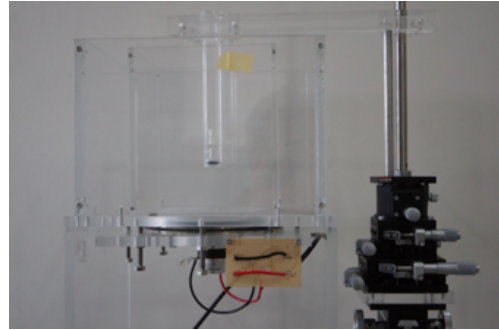
図2 固定式定在波型超音波照射システムのブロック図

地を5～10 ml 入れ、CO₂ インキュベータ (5 % CO₂、37℃) 内に静置して培養する。当研究室にて培養した、MIA-PaCa2 の位相差顕微鏡写真を図1 に示す。

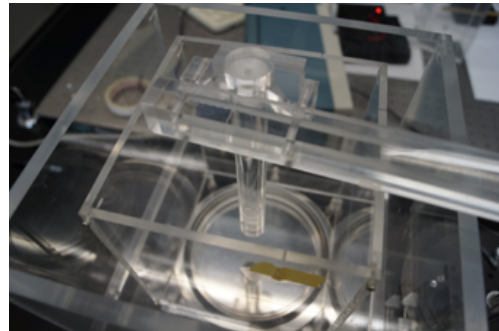
3. 実験システム

3.1 定在波型超音波照射システム

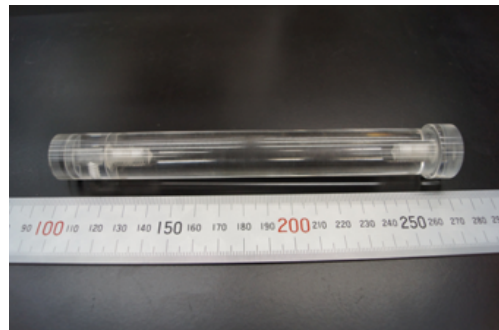
膵臓腺癌細胞株 MIA-PaCa2 への超音波照射に伴い、当研究室の渡邊が作製した周波数 150 kHz 定在波型超音波照射システムを使用した^[4]。照射システムの水槽底部に円形の音響窓 (φ120 mm) があり、その下部にフッ素系ゴム製の O リングを介してステンレス振動板 (φ180 mm) が装着されている。ステンレス振動板の裏側に共振周波数 40 kHz のランジュバン振動子 (Honda Elec、HEC-45402) が装着しており、ランジュバン振動



(a) 正面から見た写真



(b) 水槽を上から見た写真



(c) 固定治具の写真

図3 固定式定在波型超音波照射システムの写真

子でステンレス振動板を振動させることにより、定在波超音波を水槽中 (140 × 140 × 170 mm²) に発生させる構造となっている。振動子が振動板に取り付けられている等からシステム全体の共振周波数が 150 kHz となっている

本実験では、ファンクションジェネレータとパワーアンプを使用して連続正弦波で印加し、連続波超音波を照射する。ステンレス振動板から高さ 45 mm における音場のピーク

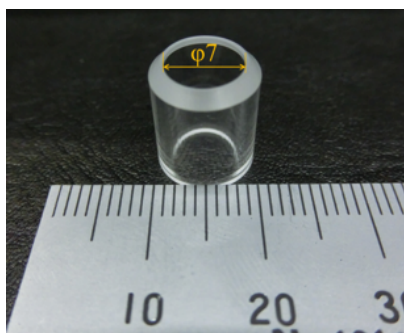


図4 音響窓付き細胞培養フラスコ

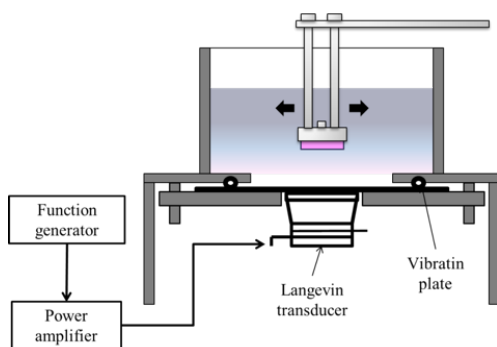
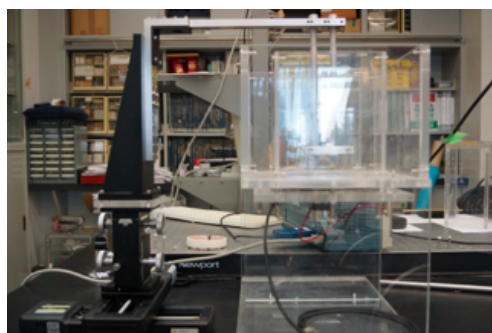


図5 走査式超音波照射システムのブロック図

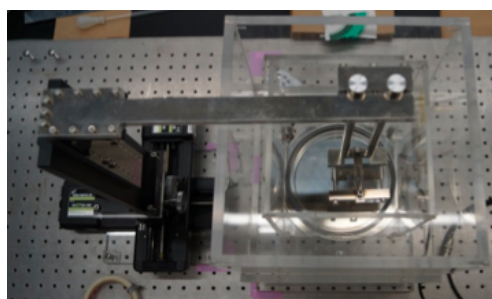
位置に、容器または移動距離の中心が位置するように固定し、照射システムの水槽内に高さ 100 mm の位置まで蒸留水で満たしている^[5]。水を入れて水温調節装置サーマルロボ (AS ONE、TR-1A) で加温した別の水槽内に、超音波照射と同じ時間沈めた細胞をネガティブコントロールとしている。

3.2 固定式細胞培養フラスコ位置決めシステム

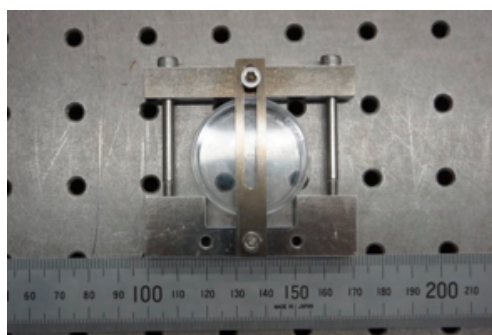
本実験では、当研究室の岩城が開発した音響窓付き細胞培養フラスコ^[6]上に MIA-Pa-Ca2 を培養し、当研究室の渡邊晶子先輩が作製した音響窓付き細胞培養フラスコ用固定治具に取り付けて音響窓付き細胞培養フラスコ内の細胞に向けて超音波照射を行う。本実験で使用した固定式細胞培養フラスコ位置決めシステムのブロック図を図2に示し、固定式細胞培養フラスコ位置決めシステムの写真を図3に示す。また、音響窓付き細胞培養フラスコの写真を図4に示す。



(a) 正面から見た写真



(b) 水槽を上から見た写真



(c) 固定治具の写真

図6 走査式定在波型超音波照射システムの写真

3.3 走査式細胞培養フラスコ位置決めシステム

本実験には市販の培養シャーレ (IWAKI、3000-035) を使用している本研究室で作製した超音波照射実験用シャーレ固定治具を使用して 5 mm ステップ 1 点あたり照射時間 15 s でシャーレ内の細胞に超音波照射を行った。本実験で使用した、走査式細胞培養フラスコ位置決めシステムのブロック図を図5に示し、走査式細胞培養フラスコ位置決めシステムの写真を図6に示す。また、自動照射プログラムのフローチャートを図7に示す。

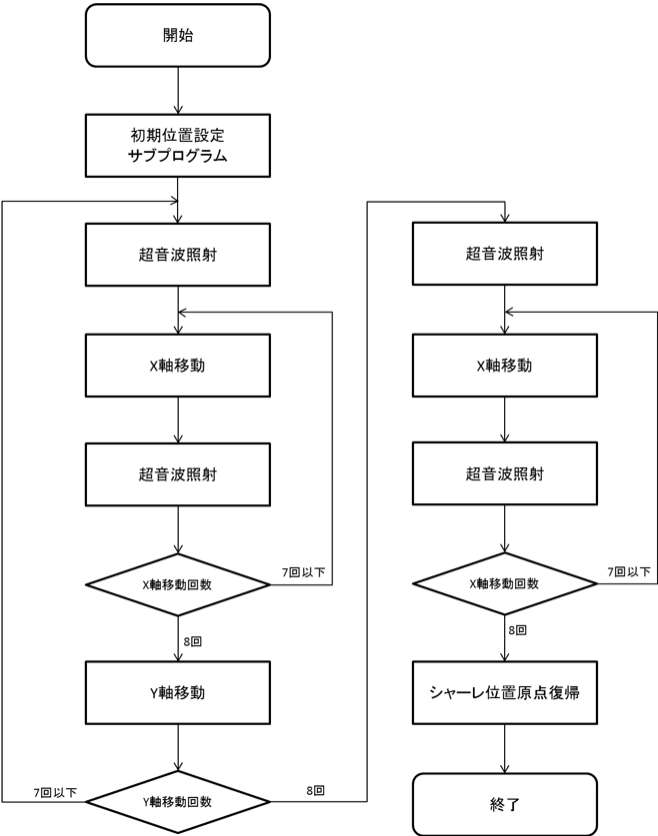


図7 自動照射プログラムのフローチャート

3.2 アガロースゲル電気泳動法

アポトーシスに伴う最も特徴的な生化学的変化がクロマチンDNAのオリゴヌクレオソーム単位での切断である。細胞より抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動で分離するとアポトーシスの指標であるラダーが確認される。

[7] 本実験では、細胞溶解バッファーにTriton X-100を使用することで核中のDNAの抽出を防ぎ、細胞質中のDNAのみを抽出した。DNA試料の作製に用いた試薬を表1に示す。

4. 超音波照射実験

4.1 実験の設定条件

音響窓付き細胞培養フラスコを用いた超音波照射実験の照射条件を表2に、自動照射プログラム(National Instruments、LabVIEW)を用いた超音波照射実験の照射条件を表3に示す。

試薬名	使用量	最終濃度	total
①細胞溶解バッファー			10ml
1M Tris - HCl/バッファー(pH7.4)	0.1ml	10mM	
0.5M EDTA(pH8.0)	0.2ml	10mM	
10% Triton X - 100	0.5ml	0.50%	
蒸留水	9.2ml		
②TEバッファー			100ml
1M Tris - HCl/バッファー(pH7.4)	1ml	10mM	
0.5M EDTA(pH8.0)	0.2ml	1mM	
蒸留水	98.8ml		
③Rnase A溶液	2μ l	20mg/ml	
④Proteinase K溶液	2μ l	20mg/ml	

表1 試薬の調製

周波数	150 kHz
印加電圧	198 V _{p-p} 、215.6 V _{p-p}
超音波照射時間	5分
細胞濃度	1.5 × 10 ⁵ cells/ml (2日間培養)
コントロールの水槽	23℃
細胞培養フラスコ	アクリルパイプ+OPSフィルム(熱溶着)

表2 音響窓付き細胞培養フラスコを用いた超音波照射実験の照射条件

4.2 音響窓付き細胞培養フラスコを用いた超音波照射実験の結果

超音波照射実験を行うための前段階として、実験を行う48時間前に音響窓付き細胞培養フラスコにMIA-PaCa2を播種し培養した。固定式細胞培養フラスコ位置決めシステムにより超音波を照射してから1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、12時間

駆動周波数	150 kHz
印加電圧	160 V _{p-p}
超音波照射時間	15 s
シャワー移動間隔	5 mm

表3 自動照射プログラム(LabVIEW)を用いた超音波照射実験の照射条件

後に細胞数のカウントを行い、超音波照射をしないサンプルをネガティブコントロールとし、その生細胞数と超音波照射を受けたサンプルの生細胞数を比較して、細胞生存率を算出する。

本実験の測定結果である、超音波照射後の細胞とネガティブコントロールの細胞の細胞数の時間変化を表したグラフを図8に、超音波照射を5分間受けた細胞の生存率の時間変化を表したグラフを図9に示す。図8の各測定点は、音響窓付き細胞培養フラスコ2つ分の細胞をビルケルチュルク血球計算盤で測定した30回分の値の平均値であり、エラーバーは標準偏差となっている。図9のグラフは、超音波照射後の細胞の生存率を算出し、時間変化に伴ってどのように変化していくのかを示している。細胞生存率は、ネガティブコントロールの細胞数の平均値を100%にした時の超音波照射後の細胞数の平均値の値である。

今回の測定では図8のグラフより、印加電圧が198 V_{p-p}のとき、超音波照射後の4時間後から6時間後にかけて細胞数が減少することが分かった。また、印加電圧215.6 V_{p-p}に設定した場合は、超音波照射後の8時間後から12時間後にかけて細胞数が減少してことを観測できた。図9のグラフでは、印加電圧が198 V_{p-p}と215.6 V_{p-p}のときに、照射の1時間後から2時間後にかけて共に細胞生存率が低下していることを分かった。最小値が印加電圧198 V_{p-p}のときに64.9%で、印加電圧215.6 V_{p-p}のときに54.0%となっている。しかし、細胞生存率はどちらも、超音波照射後の時間経過とともに、100%を超えることがあった。これは、今回の超音波照射実験で準備したサンプル数が少なく、また、超音波の照射されていない細胞が照射された細胞と混ざってしまい、超音波照射を受けていない細胞の数が時間とともに増殖したためと考えている。

4.3 自動照射プログラム (LabVIEW) を用い

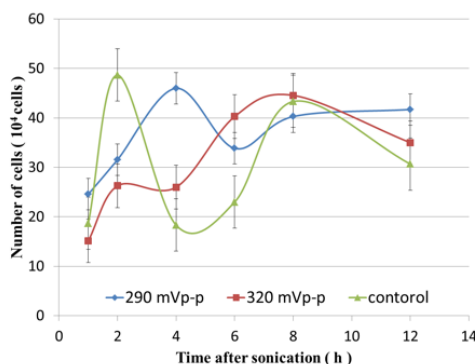


図8 超音波照射後の細胞とネガティブコントロールの細胞の細胞数の時間変化を表したグラフ

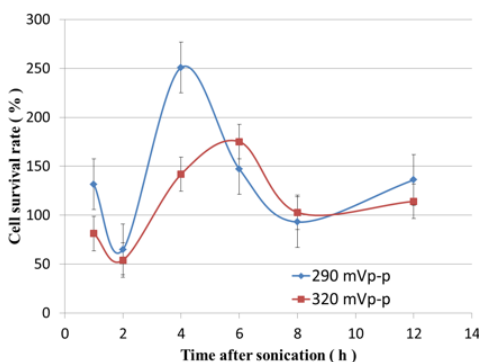


図9 超音波照射を5分間受けた細胞の生存率の時間変化を表したグラフ

た超音波照射実験の結果

超音波照射実験を行うための前段階として、実験を行う48時間前に市販されている培養面積9 cm²のシャーレにMIA-PaCa2を3 × 10⁵ cells 播種し培養した。走査式細胞培養フラスコ位置決めシステムによる超音波を照射してから経過時間での細胞生存率とアガロースゲル電気泳動法によるアポトーシス評価を行った。経過時間での生存率変化では、経過時間全ての生存率が100%以下の値になった。しかし、最低生存率が88.8%であり時間経過ごとに上昇する傾向を示した。アガロースゲル電気泳動法によるアポトーシス評価では、経過日数ごとに細胞質中のDNA量が多くなり経過2日後とL-アスパラギナーゼ添加には同じような微かなラダーのようなものを観察できた。時間経過による生存率変化のグラ

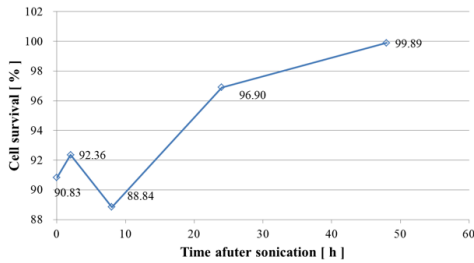
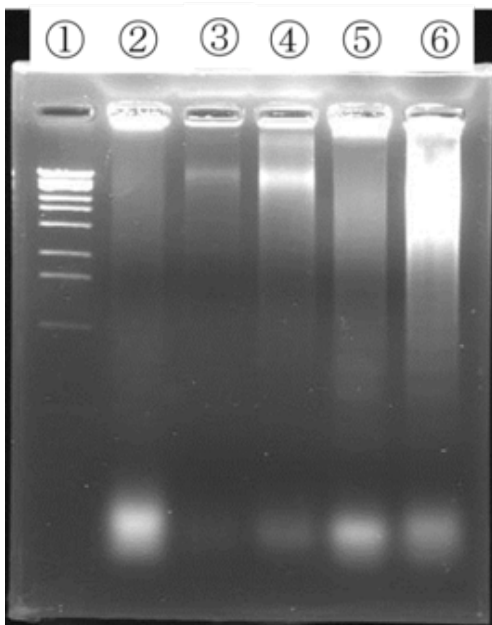


図 10 時間経過による生存率変化のグラフ



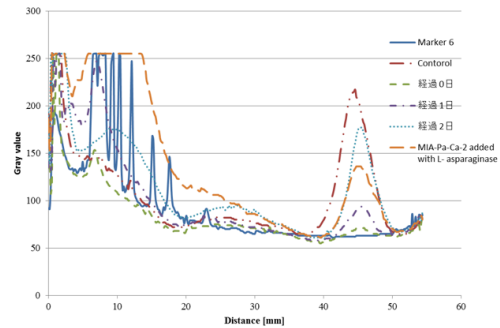
① Marker 6、②コントロール、③経過 0 日、④経過 1 日、⑤経過 2 日、⑥ L-アスパラギナーゼ添加

図 11 アガロースゲル電気泳動像

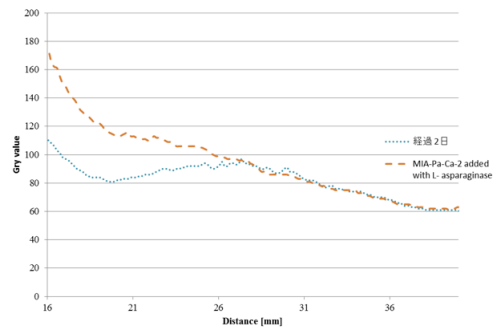
フを図 10、アガロースゲル電気泳動像を図 11、電気泳動像の ImageJ による発光分布を図 12 に示す。

5. まとめと今後の課題

音響密付き細胞培養フラスコを用いた超音波照射実験では、印加電圧 $198 V_{p-p}$ のとき、超音波照射後の 4 時間後から 6 時間後にかけて細胞数が減少することを確認した。また、印加電圧が $215.6 V_{p-p}$ の場合では、超音波照射後の 8 時間後から 12 時間後にかけて細胞



(a) 全体のポケットからの輝度分布



(b) 微かなラダー部分の輝度分布

図 12 電気泳動像の ImageJ による発光分布

数が減少してことを確認した。超音波照射を 5 分間受けた細胞の生存率の時間変化を見ると、印加電圧が $198 V_{p-p}$ と $215.6 V_{p-p}$ のときに、照射の 1 時間後から 2 時間後にかけて共に細胞生存率が低下していることを確認した。しかし、細胞生存率はどちらも、超音波照射後の時間経過とともに、100 % を超えることがあることが確認されている。これは、コントロールの細胞の不具合や超音波照射後の手技のミス、また、超音波の照射されていない細胞が照射された細胞と混ざってしまい、超音波照射を受けていない細胞の数が時間とともに増殖したためと考えている。そこで、今後の課題として、超音波照射実験の手技の再確認、照射実験の回数の増加をしなければいけないと考えられる。

自動照射プログラム (LabVIEW) を用いた超音波照射実験では、時間経過における生存率の変化があまり確認できなかったがアガロースゲル電気泳動では微かなラダーを確認

することができた。今後は実験条件では、印加電圧を高くすることで細胞への影響を強くし、評価では、DNA の抽出方法を変更することでラダーが確認しやすい方法を検討する。

【参考文献】

- [1] メディックメディア：病気がみえる
(vol. 1)
- [2] 矢島恭一：平成 19 年度 卒業論文
- [3] 膀胱癌を処置するための医薬：[http://
www.ekouhou.net](http://www.ekouhou.net)
- [4, 5] 平成 25 年度 博士学位論文 渡邊晶子
- [6] 岩城咲乃：Japanese Journal of Applied Physics 53, 07KF12 (2014)
- [7] 辻本賀英：新アボトーシス実験法 改訂第 2 版 羊土社

